

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

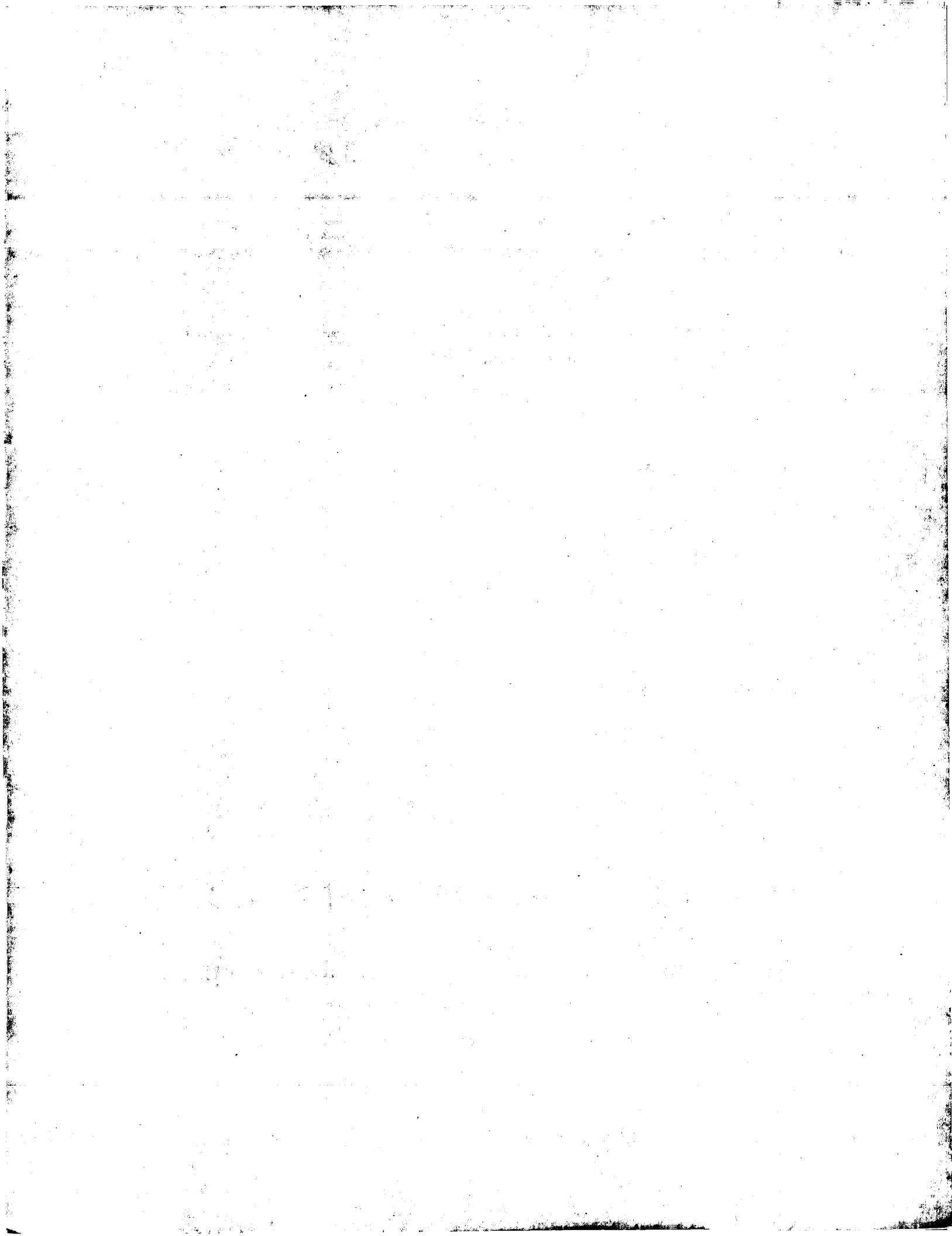
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



(9) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

## (12) Offenlegungsschrift

(11) DE 30 42 857 A 1

(51) Int. Cl. 3:

C 12 Q 1/58

DE 30 42 857 A 1

(21) Unionspriorität: (22) (33) (31)

13.11.79 JP P146000-79

(72) Erfinder:

Seshimoto, Osamu; Kitajima, Masao, Asaka, Saitama, JP

(71) Anmelder:

Fuji Photo Film Co. Ltd., Minami-Ashigara, Kanagawa, JP

(74) Vertreter:

Kohler, M., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Gernhardt, C.,  
Dipl.-Ing., 8000 München; Glaeser, J., Dipl.-Ing., Pat.-Anw.,  
2000 Hamburg

(54) Mehrschichtiges chemisches Analysenmaterial zur Analyse wässriger Flüssigkeiten

DE 30 42 857 A 1

P a t e n t a n s p r ü c h e

1) Mehrschichtiges chemisches Analysenmaterial für die Analyse von wässrigen Flüssigkeiten, bestehend aus

- (a) einem lichtdurchlässigen wasserundurchlässigen Träger, der darauf aufeinanderfolgend ausgebildet hat
- (b) eine Reagenschicht und
- (c) eine poröse Probeausbreitungsschicht, wobei
  - (i) die Reagenschicht (b) einen in einem hydrophilen Binder dispergierten Farblackvorläufer enthält,
  - (ii) Urease in der Reagenschicht (b) oder in einer an die Reagenschicht (b) anstoßenden Schicht einverleibt ist und
  - (iii) ein Metallsalz zur Bildung eines Farblakes oder ein Metalloxid zur Bildung eines Farblakes, welche praktisch die Aktivität der Urease nicht hemmen, in die Reagenschicht (b) oder in eine an diese Reagenschicht (b) anstoßende Schicht einverleibt ist oder ein Metallsalz oder Metalloxid zur Ausbildung des Farbstoffes in eine Schicht anstoßend an die Reagenschicht (b) einverleibt ist.

2) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Analysenmaterial weiterhin

- (d) eine Strahlungsblockierungsschicht enthält, die zwischen der Reagenschicht (b) und der porösen Probeausbreitungsschicht (c) zwischengeschichtet ist.

3) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die wässrige Flüssigkeit aus einer Harnstoff enthaltenden Flüssigkeit b steht.

130021/0888

4) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die wässrige Flüssigkeit aus Blut, Urin, Spinalflüssigkeit, Saliva oder anderen Körperflüssigkeiten besteht.

5) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der lichtdurchlässige wasserundurchlässige Träger aus einem synthetischen Harzfilm, einem Film aus regenerierter Cellulose oder einer Glasplatte besteht.

6) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Probeausbreitungsschicht aus einer Schicht aus einem Tuch besteht, welches aus natürlichen Fasern, synthetischen Fasern oder Gemischen hiervon aufgebaut ist.

7) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Tuch einer Behandlung unterworfen wurde, um es hydrophil zu machen.

8) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Probeausbreitungsschicht aus einer Schicht eines nicht-fasrigen isotropen porösen Materials besteht.

9) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die wässrige Flüssigkeit aus Gesamtblut, Blutserum oder Blutplasma besteht.

10) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Farblackvorläufer aus einer Verbindung mit dem Gehalt einer zur Wechselwirkung mit einem Metall fähigen Verbindung besteht.

11) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Farblackvorläufer aus einer Verbindung mit einer oder mehreren Gruppen -OH, -SH, C=O,

130021/0896

C=S, =N-R, worin R eine organische Gruppe bedeutet, und -NH<sub>2</sub> besteht.

12) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Farblackvorläufer aus Hämatoxylin, Brazilin, Dithizon, Diphenylcarbazid, Oxin, Rubeansäure, Formaldoxin, Dimethylglyoxim, Alizarin oder Natriumrhodinat besteht.

13) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Farblackvorläufer aus Hämatoxylin besteht.

14) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Material so aufgebaut ist, daß die Farbreaktion in dem chemischen Analysenmaterial bei einem pH-Wert von etwa 6,5 oder höher erfolgt.

15) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der hydrophile Binder aus einem wasserlöslichen hochmolekularen Polymeren besteht.

16) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das hochmolekulare Polymere aus einem wasserlöslichen Protein, einem pflanzlichen Gummi oder einem synthetischen Polymeren besteht.

17) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Material zusätzlich in der Reagensschicht oder in einer weiteren Schicht hiervon mindestens einen Stabilisator und einen Puffer enthält.

18) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Metallsalz zur Bildung des Farblackes oder das Metalloxid zur Bildung des Farblackes aus einem Salz oder Oxid eines Metalles der Gruppen IIA, IIB, IIIA, IVA, IVB, VIA, VIIA oder VIII des Periodensystems besteht.

130021/0898

19) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Flüssigkeit aus einer harnstoffhaltigen Flüssigkeit besteht.

20) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Flüssigkeit aus Blut, Urin, Spinalflüssigkeit, Saliva oder einer anderen Körperflüssigkeit besteht.

21) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der lichtdurchlässige wasserundurchlässige Träger aus einem synthetischen Harzfilm, einem Film aus regenerierter Cellulose oder einer Glasplatte besteht.

E.

22) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Probeausbreitungsschicht aus einer Schicht eines aus natürlichen Fasern, synthetischen Fasern oder Gemischen hiervon aufgebauten Tuches besteht.

23) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß das Tuch einer Behandlung, um es hydrophil zu machen, unterworfen worden ist.

24) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Probeausbreitungsschicht aus einer Schicht eines nicht-faserförmigen isotropen porösen Materials besteht.

25) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Flüssigkeit aus Gesamtblut, Blutserum oder Blutplasma besteht.

26) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Farblackvorläufer aus einer Verbindung mit dem Gehalt einer zur Wchselwirkung mit einem Metall fähigen Verbindung besteht.

130021/0896

27) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Farblackvorläufer aus einer Verbindung mit einer oder mehreren Gruppen -OH, -SH, C=O, C=S, =N-R, worin R eine organische Gruppe bedeutet, und -NH<sub>2</sub> besteht.

28) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Farblackvorläufer aus Hämatoxillin, Brazilin, Dithizon, Diphenylcarbazid, Oxin, Rubeansäure, Formaldoxim, Dimethylglyoxim, Alizarin oder Natriumrhodinat besteht.

29) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Farblackvorläufer aus Hämatoxillin besteht.

30) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Material einen solchen Aufbau hat, daß eine Farbreaktion in dem chemischen Analysenmaterial bei einem pH-Wert von etwa 6,5 oder höher erfolgt.

31) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der hydrophile Binder aus einem wasserlöslichen hochmolekularen Polymeren besteht.

32) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß das hochmolekulare Polymere aus einem wasserlöslichen Protein, einem pflanzlichen Gummi oder einem synthetischen Polymeren besteht.

33) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Material zusätzlich in der Reagensschicht oder in einer weiteren Schicht hiervon mindestens einen Stabilisator und einen Puffer enthält.

34) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Metallsalz zur Bildung des Farblacks oder das Metalloxid zur Bildung des Farblacks aus einem Salz oder Oxid eines Metalls der Gruppen IIA, IIB, IIIB, IVA, IVB, VIA, VIIA oder VIII des Periodensystems besteht.

35) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Material in der Reihenfolge von dem lichtdurchlässigen wasserundurchlässigen Träger eine Reagensschicht mit dem Gehalt des Farblackvorläufers, Urease, eines Metallsalzes oder Oxides zur Ausbildung des Farblacks und ein Pufferungsmittel, eine Strahlungsblockierungsschicht und die poröse Probeausbreitungsschicht enthält.

36) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Material in der Reihenfolge von dem lichtdurchlässigen wasserundurchlässigen Träger eine Schicht aus dem Metallsalz oder Oxid zur Farblackausbildung, die Reagensschicht mit dem Gehalt eines Farblackvorläufers und Urease, die Strahlungsblockierungsschicht und die porösen Probeausbreitungsschicht enthält.

37) Chemisches Analysenmaterial nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Material in der Reihenfolge von dem lichtdurchlässigen wasserundurchlässigen Träger eine Schicht eines Metallsalzes oder Oxides zur Farblackausbildung, die Reagensschicht mit dem Gehalt eines Farblackvorläufers und Urease und die poröse Probeausbreitungsschicht enthält, wobei die poröse Probeausbreitungsschicht gleichfalls zur Blockierung von Strahlung fähig ist.

38) Mehrschichtiges chemisches Analysenmaterial zur Analyse einer wässrigen Flüssigkeit, bestehend aus

(a) einem lichtdurchlässigen wasserundurchlässigen Träger, welcher hierauf aufeinanderfolgend ausgebildet hat

130021/0896

3042857

(b) eine Reagensschicht mit einem zur Ausbildung eines Farblacks fähigen System und

(c) eine poröse Probeausbreitungsschicht,

wobei die Reagensschicht (b) und die poröse Probeausbreitungsschicht (c) hydrophil sind.

130021/0898

WIEGAND NIEMANN  
KOHLER GERNHARDT GLAESER  
PATENTANWALTE  
Zugelassen beim Europäischen Patentamt

3042857

MÜNCHEN  
DR. E. WIEGAND  
DR. M. KOHLER  
DIPL-ING. C. GERNHARDT

HAMBURG  
DIPL-ING. J. GLAESER

DIPL-ING. W. NIEMANN  
OF COUNSEL

8

TELEFON: 089-55547617  
TELEGRAMME: KARPATENT  
TELEX: 529068 KARP D

D-8000 MÜNCHEN 2  
HERZOG-WILHELM-STR. 16

W. 43815/80 - Ko/G

13. November 1980

Fuji Photo Film Co., Ltd.,  
Minami Ashigara-Shi,  
Kanagawa (Japan)

Mehrschichtiges chemisches Analysenmaterial  
zur Analyse wässriger Flüssigkeiten

Die Erfindung betrifft ein mehrschichtiges chemisches Analysenmaterial zur Anwendung bei der Analyse von wässrigen Flüssigkeitsproben zur Bestimmung spezifischer darin enthaltener Bestandteile. Das chemische Analysenmaterial besteht aus einem Träger, einer Reagensschicht und einer Probeausbreitungsschicht oder es besteht aus einem Träger, einer Reagensschicht, einer Strahlungsblockierungsschicht und einer Probeausbreitungsschicht. Insbesondere ist im chemischen Ana-

130021/0898

lysenmaterial in der Reagensschicht ein Farblackvorläufer in einem hydrophilen Binder dispersiert, Urease ist in der Reagensschicht oder in einer hieran anstoßenden Schicht vorhanden und ein farblackbildendes Metallsalz oder farblackbildendes Metalloxid, welches praktisch die Aktivität der Urease nicht hemmt, ist in die Reagensschicht oder in eine Schicht anstoßend hierzu einverleibt oder eine das farblackbildende Metallsalz oder farblackbildende Metalloxid enthaltende Schicht ist unabhängig anstoßend an die Reagensschicht ausgebildet.

Als mehrschichtige chemische Analysenmaterialien (Bahnform), welche die Analyse durch Trockenverfahren erlauben, sind diejenigen, welche einen Träger mit einer darauf aufeinanderfolgend aufgebauten einschichtigen oder doppelschichtigen Reagensschicht und eine nicht-faserförmige isotrope Probeausbreitungsschicht umfassen, bekannt und beispielsweise in der japanischen Patentveröffentlichung 33800/74 entsprechend der US-Patentschrift 3 630 957, der japanischen Patentveröffentlichung 53888/74 entsprechend der US-Patentschrift 3 992 158, 137192/75 entsprechend der US-Patentschrift 3 977 568, 40191/76 entsprechend der US-Patentschrift 4 042 335, 3488/77 entsprechend der US-Patentschrift 4 066 403, 89796/78 entsprechend der US-Patentschrift 4 069 017 und 131089/78 entsprechend der US-Patentschrift 4 144 306 beschrieben. Falls eine wässrige Flüssigkeitsprobe auf die Probeausbreitungsschicht dieser Materialien aufgetragen wird, wandert die wässrige Flüssigkeitsprobe in die Reagensschicht unter einheitlicher Konzentration und verursacht dort das Auftreten einer Farbbildungsreaktion. Die auftretenden Änderungen der Farbdichte ermöglichen, die Konzentration oder das Niveau bestimmter Bestandteile in der wässrigen Flüssigkeitsprobe zu bestimmen.

Zur Bestimmung einer bestimmten Komponente in einer wässrigen Flüssigkeit kann sehr häufig in einziges Reagenz für die chemische Analyse nicht angewandt werden und in zahlreichen Fällen werden mehrere Reagenzien in Kombination verwendet. Bei-

130021/0898

spielsweise wird zur Bestimmung des Harnstoffes im Blut ein direkte Bestimmung des Harnstoffes mit einem einzigen Reagenz gewöhnlich nicht angewandt. Im allgemeinen wird Harnstoff durch einige Stufenreaktionen bestimmt. Beispielsweise wird Harnstoff zunächst enzymatisch mit einem ersten Reagenz, Urease, unter Bildung von Ammoniak zersetzt und das Ammoniak wird wiederum in Kontakt mit einem zweiten Reagenz, beispielsweise einem pH-Indikator oder einem Gemisch aus einem Diazoniumsalz und einem Kuppler gebracht, so daß eventuell die Anwesenheit des Harnstoffes durch das Farbausbildungssystem bestimmt wird.

Mehrschichtige Analysenblätter unter Anwendung einer Vielzahl von Reagenzien für eine mehrstufige Reaktion, wie vorstehend beschrieben, umfassen solche, worin sämtliche notwendigen Reagenzien in eine einzige Reagenschicht einverleibt werden können, und solche, wo die Reagenzien üblicherweise in ein primäres Reagenz und ein sekundäres Reagenz in Abhängigkeit von der Reihenfolge der Reaktionen unterteilt sind, wobei jedes Reagenz in eine Reagenschicht einverlebt ist oder eine unterschiedliche Reagenschicht bildet.

Darüberhinaus haben die mehrschichtigen chemischen Analysenblätter, wie sie in der US-Patentschrift 3 011 874 und der japanischen Patentanmeldung 3488/77 beschrieben sind, eine komplizierte mehrschichtige Struktur, wobei die Reagenzien getrennt in zwei Schichten einverlebt sind, wobei eine Reagenschicht unter Anwendung eines hydrophoben Binders ausgebildet ist oder mit einer hydrophoben Membran zum Schutz gegenüber dem Eindringen von Wasser bedeckt ist. Somit sind die Reaktionen zur Bestimmung einer Komponente in einer wässrigen Flüssigkeitsprobe klar in zwei Stufen unterteilt, nämlich erstens die wässrige Reaktion und dann die nicht-wässrige Reaktion.

Mehrschichtige chemische Analysenblätter mit dem vorstehend geschilderten mehrschichtigen Aufbau werden allgemein durch Wiederholung der Stufen des Aufziehens einer hydrophil n

130021/0898

Binderschicht auf eine hydrophobe Binderschicht hergestellt. Dadurch ergibt sich häufig eine Abschichtung auf Grund der schwachen Haftung zwischen den beiden Schichten. Infolgedessen wird in der Praxis mindestens eine Klebschicht, die als Grundierschicht oder als Zwischenschicht bezeichnet wird, auf der hydrophilen Binderschicht ausgebildet, worauf darauf die hydrophile Binderschicht ausgebildet wird. Um somit eine Reagenzschicht in Form von zwei Schichten auszubilden, nämlich einer hydrophoben Schicht und einer hydrophilen Schicht, sind Herstellungsstufen erforderlich, die ziemlich kompliziert sind.

Bei einem Analyseverfahren zur Bestimmung einer spezifischen Komponente in einer wäßrigen Lösungsprobe, bei der eine Mehrzahl von in zwei oder mehr Gruppen unterteilten Reagenzien erforderlich ist und eine Gruppe der Reagenzien in einer hydrophilen Umgebung und die andere Gruppe der Reagenzien in einer nicht-wäßrigen Umgebung reagieren, werden bei den üblichen bekannten Verfahren mehrschichtige chemische Analysenmaterialien mit einem komplizierten Aufbau angewandt, wobei die Reagenzien getrennt in eine hydrophile Binderschicht und eine hydrophobe Binderschicht einverlebt sind. Andererseits hat bei dem mehrschichtigen chemischen Analysenmaterial gemäß der Erfindung zur Analyse einer wäßrigen Flüssigkeitsprobe die Reagenzschicht des Analysenmaterials eine einschichtige oder mehrschichtige Struktur, die durch einen hydrophilen Binder getragen wird. Dadurch werden das Aufziehen und infolgedessen die Herstellungsstufen vereinfacht.

Eine Aufgabe der Erfindung besteht in mehrschichtigen chemischen Analysenmaterialien zur Analyse von wäßrigen Flüssigkeiten, welche in einer Ausführungsform

- (a) einen lichtdurchlässigen, wasserundurchlässigen Träger mit darauf aufeinanderfolgend ausgebildet
- (b) einer Reagenzschicht und
- (c) einer porösen Probeausbreitungsschicht umfaßt,

wobei

130021/0898

- (i) die Reagenschicht (b) den in einem hydrophilen Binder dispergierten Farblackvorläufer enthält,
- (ii) Urease in die Reagenschicht (b) oder in eine an die Reagenschicht (b) anstoßende Schicht einverleibt ist und
- (iii) ein farblackbildendes Metallsalz oder ein farblackbildendes Metalloxid, welches praktisch die Aktivität der Urease nicht hemmt, in die Reagenschicht (b) oder in eine an die Reagenschicht (b) anstoßende Schicht einverleibt ist oder ein farblackbildendes Metallsalz oder ein farblackbildendes Metalloxid in eine an die Reagenschicht (b) anstoßende Schicht einverleibt ist.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung liefert die Erfindung ein chemisches Analysenmaterial, wie vorstehend beschrieben, welches zusätzlich

- (d) eine Strahlungsblockierungsschicht enthält, die zwischen der Reagenschicht (b) und der porösen Probeausbreitungsschicht (c) zwischengeschichtet ist.

In den Zeichnungen stellen

die Fig. 1 bis 3 schematische Ansichten dar, die Schichtungsstrukturen spezifischer Beispiele der mehrschichtigen chemischen Analysenmaterialien gemäß der Erfindung zur Anwendung bei der Analyse von wässrigen Flüssigkeiten zeigen.

Im Rahmen der Beschreibung der Erfindung im einzelnen vereinfacht die praktisch einschichtige Struktur der Reagenschicht des chemischen Analysenmaterials gemäß der Erfindung in der vorstehenden Weise die Überzugsstufe im Vergleich zu derjenigen für übliche mehrschichtige Materialien und, da ein wässriges Überziehen ermöglicht wird, werden die Herstellungskosten verringert und es wird eine ausgezeichnete Sicher-

130021/0898

heit erzielt. Frher wird das Verbllassen, das bei den üblichen Materialien erf lgt und in ernsthaften Fehler bei den üblichen Feststellungsverfahren unter Anwendung eines pH-Indikators darstellt, bei dem chemischen Analysenmaterial gemäß der Erfindung vermieden oder markant verringert. Es wird eine Farbe, die sich im Verlauf der Zeit nicht ändert und eine ausgezeichnete Lichtverblassungsbeständigkeit bei einem stabilen Farbton in dem chemischen Analysenmaterial gemäß der Erfindung erzielt. Somit wird ein stabiles Analysenverhalten mit hoher Genauigkeit unter Anwendung dieses Materials erreicht. Das chemische Analysenmaterial gemäß der Erfindung ist besonders zur Behandlung mit großen Mengen geeignet.

Das mehrschichtige chemische Analysenmaterial gemäß der vorliegenden Erfindung zur Anwendung bei der Analyse von wässrigen Flüssigkeiten wird zur Analyse von Flüssigkeitsproben verwendet, insbesondere von Harnstoff in Körperflüssigkeiten. Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Spinalflüssigkeit, Saliva und dergleichen, werden üblicherweise einer Analyse unterworfen und das mehrschichtige chemische Analysenmaterial gemäß der Erfindung ist wertvoll zur Analyse dieser sämtlichen Flüssigkeiten. Von diesen Körperflüssigkeiten ist die Analyse des Bluts besonders wichtig. Der Blutharnstoffstickstoff (BUN) wird häufig als Diagnosewert zur Prüfung der Renalfunktion angewandt.

Übliche Verfahren wurden bereits entwickelt und in die Praxis zur Bestimmung von BUN eingeführt, jedoch sind bei diesen Verfahren die zu analysierenden Flüssigkeiten in zahlreich n Fällen Blutserum oder Blutplasma, wobei die Umsetzung in ver dünnter Lösung durchgeführt wird.

Das Verfahren unter Anwendung des mehrschichtigen chemischen Analysenmaterials gemäß der Erfindung zur Analyse wässriger Flüssigkeit nfordert kinerlei Verdünnungsmittel, d.h.

130021/0808

es läßt sich als Trockenchemi bez ichnen, und stellt ein Mittel zur Analys iner wäßrigen Flüssigkeit mit extrem hoher Genauigkeit dar.

Das chemische Analysenmaterial gemäß der Erfindung kann zur Analyse nicht nur von Blutserum oder Plasma, sondern auch von Gesamtblut als Flüssigkeit für die direkte Analyse durch Kombination der in der japanischen Patentanmeldung 83608/79 entsprechend der US-Patentanmeldung Serial No. 165 444 vom 2.Juli 1980 dar, wobei auf die Beschreibung dieser Anmeldung hier besonders Bezug genommen wird. Falls das Gesamtblut als Flüssigkeit analysiert wird, sind die Bestimmungsverfahren exakt die gleichen wie im Fall der Analyse von Blutserum oder Plasma und es ist einzig erforderlich, daß eine geringe Menge, beispielsweise 5 bis 20  $\mu$ l des Gesamtblutes als Fleck auf das chemische Analysenmaterial gegeben wird. Verfahren zur Entfernung der Erythrozyten, wie Waschen oder Abwischen nach dem Auftröpfen des Gesamtblutes, die als notwendig hinsichtlich der Analysenflecken vom Testpapiertyp betrachtet wurden, sind überhaupt nicht bei dem chemischen Analysenmaterial gemäß der vorliegenden Erfindung notwendig.

Bei der Bestimmung des Niveaus von Harnstoff in Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, wurde bisher ein pH-Indikator verwendet und die Änderung des pH-Werts nach der Zersetzung des Harnstoffes zu Ammoniak durch die Urease wurde festgestellt. In diesem Fall entweicht jedoch das gebildete Ammoniak aus dem System auf Grund von Verdampfung oder der gleichen, wodurch ein Verbllassen oder Verschwinden der angezeigten Farbe auftritt. Dies macht eine genaue Bestimmung des Harnstoffs schwierig.

Durch das chemische Analysenmaterial gemäß der Erfindung wird das vorstehende Problem gelöst. Im Fall der Anwendung von beispielsweise Hämatoxylin als Farblackvorläufer tritt eine Änderung vom farblosen Zustand zu einem röthlich-violetten Zustand auf Grund der Einwirkung des Alkalis auf, j doch ver-

130021/0898

blaßt, falls es als solches gehalten wird, die dabei gebildete Farb allmählich. Falls jedoch wirksam eine Oxidationsreaktion parallel stattfindet, wird rotes Hämatein gebildet. In diesem Fall wird bei Anwesenheit eines hier angegebenen Metallsalzes, wie Eisen-Natriumäthylendiamintetraacetat (EDTA-Fe(III)-Na) oder dergleichen ein blau-violetter Farblack gebildet. Die Farbe dieses Farblackes verschwindet nicht und infolgedessen kann das Harnstoffniveau genau gemessen werden. Da ferner der einmal gebildete Farbstoff bei Anwendung des chemischen Analysenmaterials gemäß der Erfindung unlöslich ist, wird die sogenannte Ringbildungerscheinung gesteuert und dadurch die Genauigkeit verbessert.

Geeignete lichtdurchlässige und wasserundurchlässige Träger für das mehrschichtige chemische Analysenmaterial, welches zur Analyse von wäßrigen Flüssigkeiten verwendet werden kann, umfassen bekannte Träger mit einer Stärke von etwa 50  $\mu\text{m}$  bis etwa 2 mm, vorzugsweise 80 bis 300  $\mu\text{m}$ . Ein derartiger Träger wird als lichtdurchlässig betrachtet, falls er für sichtbares und nahe ultraviolettes Licht transparent ist, beispielsweise mit einer Wellenlänge von etwa 290 nm bis 400 nm. Geeignete Beispiele umfassen synthetische Harzfilme wie Polyester und Polycarbonate z.B. Polyäthylenterephthalat oder Polycarbonate von Bisphenol A, Celluloseester z.B. Cellulosediacetat, Cellulosetriacetat, Celluloseacetatpropionat und dergleichen, Polymethylmethacrylat und dergleichen, regenerierte Cellulose und Glasplatten. Bei hydrophoben Trägern, welche eine unzureichende Haftung mit dem hydrophilen Binder der Reagensschicht zeigen, können bekannte Hilfsbehandlungen, um die Trägeroberfläche hydrophil zu machen, angewandt werden, beispielsweise Bestrahlung mit Ultravioletlicht, Bestrahlung mit Elektronenstrahlen, Flammbehandlung, Hydrolyse mit Alkali und dergleichen, Ausbildung einer Unterüberzugsschicht aus einem Material, welches eine geeignete Haftung sowohl am Träger als auch am hydrophilen Binder der Reagensschicht besitzt, auf der Oberfläche des Trägers und Ausbildung von feinen Ungleichmäßigkeiten auf der Trägeroberfläche zu solchem Ausmaß, daß die Lichtdurchlässigkeitseigenschaften nicht ernsthaft ver-

130021/0898

ringert werden, z.B. Körnung, elektrolytische Ätzung und der gleichen. Ferner sind verwendbare geeignete lichtdurchlässige wasserundurchlässige Träger solche Träger, die durch vorhergehendes Aufziehen einer ätzenden Polymerschicht auf die vorstehend beschriebenen Träger hergestellt wurden. Im allgemeinen werden farblose transparente Träger verwendet. Um jedoch die Beobachtung oder Messung der Färbungs- oder Entfärbungsreaktion in der Reagensschicht zu erleichtern und den Kontrast zwecks Verbesserung der Genauigkeit der Beobachtung oder Messung zu erhöhen, können auch gefärbte transparente Träger in den chemischen Analysenmaterialien gemäß der Erfindung eingesetzt werden.

Geeignete poröse Probeausbreitungsschichten, die in dem mehrschichtigen chemischen Analysenmaterial gemäß der Erfindung verwendet werden können, umfassen Tücher, vorzugsweise solche, die einer Behandlung unterworfen wurden, um sie hydrophil zu machen. Beispiele für hydrophil gemachte Tücher umfassen ausreichend durch Wäsche und anschließende Trocknung entfettete Tücher und nach der Entfettung durch Wäsche mit geringen Mengen eines oberflächenaktiven Mittels, eines Benetzungsmittels und eines hydrophilen Polymeren, welche gegebenenfalls  $TiO_2$  oder  $BaSO_4$  als feine Pulver darin dispergiert darin enthalten, imprägniert wurden. Die Verfahren und zur Anwendung geeigneten Tücher, um die Tücher hydrophil als poröse Probeausbreitungsschicht zu machen, sind im einzelnen in der japanischen Patentanmeldung 72047/79 entsprechend der US-Patentanmeldung Serial No. 157 735 vom 9. Juni 1980 beschrieben, auf die hier besonders Bezug genommen wird und die hier ebenfalls angewandt werden können. Die poröse Probeausbreitungsschicht kann eine Stärke von etwa 80  $\mu m$  bis etwa 1 mm, vorzugsweise etwa 100  $\mu m$  bis 400  $\mu m$ , angegeben als Stärke, nachdem sie hydrophil gemacht ist und natürlich getrocknet ist, betragen. Ferner können die verwendbaren Tücher gewirkt oder gewebt sein und geeignete Beispiele für verwendbare Tücher umfassen Tücher, die aus Naturfasern aufgebaut sind, Tücher aus Mischgarnen aus Naturfasern und synthetischen

130021/0898

Polymeren und Tücher, die aus synthetischen Polymeren aufgebaut sind.

Falls die poröse Probeausbreitungsschicht ein hydrophil gemachtes Tuch umfaßt, kann die Probeausbreitungsschicht durch Verbinden des hydrophilen Tuches mit der Reagenschicht ausgebildet werden.

Verfahren zum Verbinden des hydrophilen Tuches mit der Reagenschicht, die angewandt werden können, umfassen ein Verfahren zur engen Kontaktierung des hydrophilen Tuches mit der Oberfläche der Reagenschicht, während die Reagenschicht halbgetrocknet ist oder während die Oberfläche der Reagenschicht mit Wasser oder mit einem oberflächenaktiven Mittel wie ein nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel enthaltendem Wasser feucht ist und erforderlichenfalls Anwendung eines geeigneten Druckes an die Anordnung, so daß die Eigenschaften des hydrophilen Binderpolymeren der Reagenschicht ausgenutzt werden. Als Alternativverfahren zur Verbindung des hydrophilen Tuches mit der Reagenschicht können ein Verfahren unter Anwendung eines Klebstoffes, durch den eine wässrige Flüssigkeitsprobe hindurchgehen kann, und ein Verfahren zur Ausbildung einer Klebstoffsicht, durch die eine wässrige Flüssigkeitsprobe hindurchgehen kann, wie nachfolgend beschrieben, auf der Reagenschicht angewandt werden.

Ferner können nicht-faserförmige isotrope poröse Materialien, wie in der japanischen Patentanmeldung 53888/74, 137192/75 und dergleichen beschrieben, gleichfalls als poröse Probeausbreitungsschicht verwendet werden.

Bei der Analyse von Blut als der mit dem mehrschichtigen chemischen Analysenmaterial gemäß der Erfindung zu analysierenden Flüssigkeit können sowohl Gesamtblut als auch Bluts rum und Blutplasma verwendet werden, wenn die poröse Probeausbreitungsschicht durch eine Schicht gebildet wird, welche hydrophil gemacht wurde. Wenn jedoch die poröse Probeausbreitungsschicht aus einem nicht-fasrigen isotropen Material ge-

130021/0898

fertigt ist, können lediglich Blutserum und Blutplasma verwendet werden und dieses Material ist für die Analyse von Gesamtblut nicht geeignet.

Die in die Reagensschicht des mehrschichtigen chemischen Analysenmaterials gemäß der Erfindung einverleibten Farblackvorläufer umfassen Verbindungen, welche irreversibel einen Farbstoff in gemeinsamer Anwesenheit eines farblackbildenden Metallsalzes oder farblackbildenden Metalloxides unter ammoniakalisch alkalischen Bedingungen bilden.

Diese Farblackvorläufer sind solche Verbindungen, die zur Wechselwirkung mit Metallen fähig sind, wie Gruppen -OH, -SH und/oder C=O, C=S, =N-R, worin R eine organische Gruppe ist, -NH<sub>2</sub> und dergleichen in ihrer Struktur vor der Umsetzung mit dem Ammoniak oder solche, welche nach der Umsetzung mit Ammoniak, wobei erforderlichenfalls Sauerstoff vorliegt, eine Struktur bilden, die die vorstehend aufgeführten reaktionsfähigen Gruppen enthält.

Beispiele für im Rahmen der Erfindung besonders günstige Farblackvorläufer umfassen solche, die im wesentlichen die Aktivität des Ammoniak freisetzenden Enzyms Urease im Verlauf des Vermischens, des Aufziehens und der Trocknungsstufen bei gemeinsamer Anwesenheit von Urease unter Anwendung eines hydrophilen Polymeren als Binder nicht schädigen und die bei der Trocknung nicht gefärbt werden. Spezifische Beispiele für derartige Farblackvorläufer umfassen Hämatoxylin, Brazilin, Dithizon, Diphenylcarbazid, Oxin, Rubeansäure, Formaldoxim, Dimethylglyoxim, Alizarin, Natriumrhodinat und dergleichen. Von diesen spezifischen Beispielen von Farblackvorläufern wird Hämatoxylin besonders bevorzugt. Obwohl auch zahlreiche andere Farbstoffvorläufer in gemeinsamer Anwesenheit eines Metallsalzes selbst in Abwesenheit von Ammoniak ziemlich gefärbt werden, wird Hämatoxylin selbst in gemeinsamer Anwesenheit von TiO<sub>2</sub> durch Steuerung des pH-Wertes nicht gefärbt, so daß dadurch die Schleierbildung auf einem

130021/0898

Minimum gehalten wird. Ferner erlaubt die ausgezeichnete Verträglichkeit des Hämatoxylins mit Gelatine, einen der nachfolgend beschriebenen hydrophilen Binder, die Durchführung des wäßrigen Überziehens. Weitere Beispiele außer Hämatoxylin, welche wenig Färbung zeigen, umfassen Oxin, Dimethylglyoxim und dergleichen. Diese haben eine schlechte Löslichkeit in Wasser und infolgedessen werden sie bevorzugt verwendet, indem sie unter Anwendung einer Emulgierung dispergiert werden.

Der pH-Bereich, worin die Färbungsreaktion in dem chemischen Analysenmaterial gemäß der vorliegenden Erfindung erfolgt, beträgt günstigerweise etwa 6,5 oder höher und infolgedessen sind Farbstoffe mit einem Farbänderungspunkt bei einem pH-Wert 5 oder niedriger schwierig vom Gesichtspunkt der Praxis anzuwenden.

Das mehrschichtige chemische Analysenmaterial gemäß der Erfindung zur Analyse wäßriger Flüssigkeiten enthält ein Harnstoffzersetzungsenzym, Urease, als notwendige Komponente bei der Analyse von Harnstoff. Harnstoff in Körperflüssigkeiten wird zu Ammoniak und Kohlendioxid durch Urease zerstellt. Das Prinzip der chemischen Analyse unter Anwendung des mehrschichtigen chemischen Analysenmaterials gemäß der Erfindung ist das folgende. Der Harnstoff in den Körperflüssigkeiten wird durch Ausnutzung der Färbungsreaktion zwischen dem Farblackvorläufer und dem farblackbildenden Metall bestimmt, welche entsprechend der Menge des bei der vorstehenden Zersetzung des Harnstoffes mittels Urease gebildeten Ammoniaks erfolgt. Die Urease kann in die Reagensschicht oder in eine hierzu anstoßende Schicht einverleibt sein. Urease kann in eine Schicht einverleibt sein, die nicht an die Reagensschicht anstößt. Da jedoch, wie vorstehend festgestellt, die Färbungsreaktion entsprechend der Menge des zu der Reagensschicht zugeführten Ammoniaks abläuft und, falls Urease in eine Schicht im Abstand von der Reagensschicht einverleibt

130021/0899

wird, wird die Färbungsreaktionswirksamkeit, d.h. die Harnstofffeststellungsempfindlichkeit, im Vergleich zu dem Fall verringert, wo die Urease in die Reagensschicht oder in eine hierzu anstoßende Schicht einverleibt ist.

Die in dem mehrschichtigen chemischen Analysenmaterial gemäß der Erfindung verwendete Menge an Urease beträgt etwa 50 bis 5 000 Sumner-Einheiten, vorzugsweise 100 bis 1 000 Sumner-Einheiten, je Gramm des Binders in der Reagensschicht oder in der hieran anstoßenden Schicht.

Beispiele für in der Reagensschicht verwendbare hydrophile Binder umfassen wasserlösliche hochmolekulare Polymere wie wasserlösliche Proteine z.B. Gelatine, Albumin oder Collagen, pflanzliche Gummis, z.B. Agar-Agar, Natriumalginat oder Agarose, und synthetische Polymere beispielsweise Vinylmonomer-Maleinsäureanhydrid-Copolymere, worin das Vinylmonomere aus Äthylen, Propylen, Styrol, Methylmethacrylat und dergleichen bestehen kann, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylamid, Polynatriumvinylbenzolsulfonat und dergleichen, welche zur Anwendung eines Filmes mit dem darin befindlichen Reagenz verwendet werden können und welche nach der Trocknung zum Durchlaß einer wässrigen Lösungsprobe mit dem Gehalt des zu analysierenden Bestandteiles fähig sind. Die in R.L. Dazidson & M. Sitting, Water-Soluble Resins, 2. Auflage, Reinhold Book Corp., New York 1968 beschriebenen Polymeren können günstigerweise als hydrophile Binder verwendet werden.

In der Praxis werden gemäß der vorliegenden Erfindung verschiedene Zusätze vorzugsweise zu der Reagensschicht oder anderen Schichten zur Aufrechterhaltung der Aktivität der Urease zugesetzt. Beispielsweise Stabilisatoren wie Äthylen-diamintetraessigsäure (EDTA) und Verbindungen mit dem Gehalt einer Gruppe -SH, beispielsweise Mercaptoäthanol. Cystin, Glutathion und dergleichen und verschiedene Puffer zur Verhinderung der Schleierbildung nach dem Aufziehen können wirk-

130021/0898

sam in die Reagensschicht einverleibt werden. Bevorzugte Beispiele derartiger Zusätze umfassen EDTA-Salze, Phosphate, Trishydroxyäthylaminomethanhydrochlorid, Borate und der gleichen. Das Überziehen wird vorzugsweise durch Pufferung der Überzugsmasse auf einen pH-Wert von 5 oder höher, stärker bevorzugt 5,5 bis 5,8 durchgeführt.

Die farblackbildenden Metallsalze oder farblackbildenden Metalloxide, die erfindungsgemäß verwendet werden können, umfassen Oxide oder Salze von mehrwertigen Metallen, die zur irreversiblen Reaktion mit den vorstehend beschriebenen Farblackvorläufern in Gegenwart von Ammoniak unter Bildung von stabilen Farbstoffen mit einer starken Absorption im sichtbaren Bereich verwendet werden können. Beispiele für Metalle zur Bildung der farblackbildenden Metallsalze oder -oxide, die verwendet werden können, sind solche, die zu den Gruppen IIA, IIB, IIIB, IVA, IVB, VIA, VIIA und VIII des Periodensystems gehören.

Es ist gut bekannt, daß zahlreiche zu den vorstehend aufgeführten Gruppen gehörende Metallionen die Aktivität der Urease hemmen. Es wurde jedoch nun gefunden, daß, selbst wenn Salze oder Oxide, die aus den vorstehend angegebenen Metallen aufgebaut sind, zusammen mit Urease vorliegen oder wenn sie in eine anstoßende Schicht einverlebt sind, die Ureaseaktivität praktisch unter bestimmten Bedingungen beibehalten wird, so daß die vorliegende Erfindung erreicht wird. Die farblackbildenden Metallsalze oder farblackbildenden Metalloxide zur Anwendung im Rahmen der Erfindung müssen im wesentlichen eine geringe Hemmwirkung auf die Urease ausüben oder müssen mit einem niedrigen Färbungsgrad geringfügig löslich sein und in gemeinsamer Anwesenheit von Ammoniak müssen sie einen Farblackfarbstoff mit einem großen molekularen Extinktionskoeffizienten bei der Bindung mit einem Farblackvorläufer bilden.

Infolg ausgedehnter Untersuchungen erwiesen sich  $TiO_2$ ,  $SiO_2$ ,  $Al_2O_3$  und Doppelsalze hiervon mit anderen Metallen, or-

130021/0896

ganische Säuresalze, Komplexsalze und dergleichen als wirksam im chemischen Analysenmaterial gemäß der Erfindung. Hiervon sind  $TiO_2$ ,  $SiO_2$ , EDTA-Salze und dergleichen besonders wirksam. Sämtliche EDTA-Salze sind im Rahmen der Erfindung wirksam. Insbesondere das Fe(III)-Salz von EDTA ist äußerst wirksam, da ein blauer, kaum löslicher Lackfarbstoff gebildet wird.

Die Reagensschicht wird durch Dispergierung des Farblackvorläufers in einem hydrophilen Binder und Aufziehen der Dispersion auf den Träger ausgebildet. Der Farblackvorläufer kann in einer Menge von etwa 10 bis 1 000 mg, vorzugsweise 50 bis 500 mg, je Gramm des Binders der Reagensschicht angewandt werden. Außerdem enthält die Reagensschicht vorzugsweise pH-Pufferungsmittel, welche EDTA-Salze, Phosphate, Borate und dergleichen umfassen. Diese pH-Pufferungsmittel können in Mengen von etwa 0,5 bis 50 mM hinsichtlich der Konzentration in der Überzugslösung angewandt werden. Erforderlichenfalls können oberflächenaktive Mittel, Härtungsmittel, Antioxidantien, Stabilisatoren, Tönungsmittel und dergleichen in die Reagensschicht einverleibt werden.

Der Farblackvorläufer kann zu der Reagensschicht durch Dispergierung beispielsweise zu feinen Teilchen, durch Emulgierung und durch Dispergierung der Emulsion wie einer Lösung in einem organischen Lösungsmittel, durch Dispergierung beispielsweise in Form von Mikrokapseln ähnlich zu zusammengesetzten feinen Teilchen oder durch Dispergierung derselben, während sie auf einem inerten Feststoff durch Adsorption getragen werden, sowie durch Auflösung wie in einer Binderlösung zugefügt werden. Von diesen Maßnahmen sind das Verfahren zur Herstellung einer Lösung in einem organischen Lösungsmittel und Emulgierung und Dispergierung derselben in einer wässrigen Binderlösung, wie im einzelnen in der japanischen Patentanmeldung 83608/79 b schrieben, äußerst wirksam im Rahmen der Erfindung. Diese Maßnahme verhindert eine Schlierbildung b im Aufziehen oder Trocknen und stellt eine Färbung mit hoher Wirksamkeit sicher.

130021/0898

Im Fall des Zusatzes eines mehrwertigen Metallocides oder Salzes zur Anwendung bei der Bildung des Farbstofflackes zu der Reagenschicht kann das Auflösungsverfahren und das Dispergierverfahren angewandt werden. Das mehrwertige Metallsalz oder Oxid kann in Mengen von etwa 5 bis 500 mg, vorzugsweise 10 bis 100 mg, je Gramm des Binders in der Reagenschicht eingesetzt werden.

Die geeignete Trockenstärke für die Reagenschicht beträgt etwa 1 bis 50  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 5 bis 30  $\mu\text{m}$ .

Das Metallsalz zur Bildung des Farbstofflackes oder das Metallocid zur Bildung des Farbstofflackes wird in die Reagenschicht in der vorstehenden Weise einverleibt und zusätzlich ist es auch möglich, unabhängig eine Metallsalz- oder Oxidschicht zur Bildung des Farbstofflackes mit dem Gehalt eines mehrwertigen Metallsalzes oder Oxides anstoßend an die Reagenschicht auszubilden. In diesem Fall kann die Menge des Metallsalzes oder des Oxides zur Bildung des Farbstofflackes die gleiche wie bei der Zugabe zu der Reagenschicht sein oder es kann eine größere Menge als diese Menge angewandt werden. D.h. Mengen von etwa 10 bis 1 000 mg, vorzugsweise 10 bis 100 mg, je Gramm des hydrophilen Binders in der Reagenschicht können eingesetzt werden. Diese Schicht kann auch pH-Pufferungsmittel, oberflächenaktive Mittel, Stabilisatoren und dergleichen enthalten. Die geeignete Stärke für die Metallsalz- oder Oxidschicht zur Farblackbildung beträgt etwa 0,5 bis 50  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 1 bis 20  $\mu\text{m}$ . Das mehrwertige Metallsalz oder Oxid kann auch getragen auf einem inerten Feinpulver aus Glas oder einem anorganischen oder organischen Material zugefügt werden.

Ferner kann das Metallsalz oder Oxid zur Farblackbildung in einer Schicht anstoßend an die Reagenschicht vorliegen, wobei diese Schicht weitere Funktionen ausübt, beispielsweise eine Strahlungsblockierungsschicht oder eine Haftungsschicht.

130021/0896

In dem mehrschichtigen chemischen Analysenmaterial gemäß der vorliegenden Erfindung zur Analyse einer wäßrigen Flüssigkeit, kann eine Strahlungsblockierungsschicht zwischen der Reagenschicht und der porösen Probeausbreitungsschicht ausgebildet werden. Ferner kann eine Klebschicht, durch die eine wäßrige Flüssigkeitsprobe hindurchgehen kann, zwischen der porösen Probeausbreitungsschicht und der Reagenschicht oder der Strahlungsblockierungsschicht zum Zweck der starken Bindung der porösen Probeausbreitungsschicht ausgebildet werden. Die Strahlungsblockierungsschicht und die Klebschicht sind im einzelnen in den vorstehend angegebenen japanischen und US-Patentanmeldungen oder -Patentschriften wiedergegeben und im Rahmen der vorliegenden Erfindung können sie zusätzlich entsprechend den dort gegebenen Anweisungen ausgebildet werden.

Als Strahlungsblockierungsschicht kann eine Schicht aus etwa 1  $\mu\text{m}$  bis etwa 50  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise etwa 2  $\mu\text{m}$  bis 20  $\mu\text{m}$  Dicke, welche durch Dispergierung eines feinen weißen Pulvers wie  $\text{TiO}_2$ -Feinpulver oder  $\text{BaSO}_4$ -Feinpulver in einem hydrophilen Binderpolymeren hergestellt wurde, eine Schicht von etwa 2  $\mu\text{m}$  bis etwa 50  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise etwa 2  $\mu\text{m}$  bis etwa 20  $\mu\text{m}$  Stärke, welche durch Dispergierung eines weißen oder schwach gefärbten Feinpulvers mit einem Metallglanz wie Aluminium in einem hydrophilen Binderpolymeren hergestellt wurde, oder eine poröse metallische Dünnschicht von etwa 5 nm bis etwa 100 nm, vorzugsweise etwa 5 nm bis etwa 50 nm Stärke, die ein weißes oder schwach gefärbtes Metall wie Aluminium enthält und zum Durchlassen einer wäßrigen Flüssigkeitsprobe fähig ist, angewandt werden.

Alternativ können die vorstehend geschilderten Pulver in die poröse Probeausbreitungsschicht einverleibt werden, so daß dadurch die poröse Probeausbreitungsschicht strahlungsblockierend wird.

130021/0896

Hinsichtlich der Klebschicht kann eine Schicht mit einer Stärke von etwa  $0,5 \mu\text{m}$  bis etwa  $10 \mu\text{m}$ , vorzugsweise etwa  $0,7 \mu\text{m}$  bis etwa  $5 \mu\text{m}$ , welche aus dem gleichen Polymeren wie das als Binder in der Reagensschicht, Strahlungsblockierungsschicht und dergleichen eingesetzte für die wäßrige Probe durchlässige hydrophile Polymere angewandt werden. Um die aus dem hydrophilen Polymeren aufgebaute Klebstoffschicht an die poröse Probeausbreitungsschicht zu binden, wird eine hydrophile wäßrige Polymerlösung auf die Reagensschicht der Strahlungsblockierungsschicht aufgezogen und, während sie mit Wasser oder Wasser mit dem Gehalt eines oberflächenaktiven Mittels nach der Trocknung halbtrocknet ist, wird ein hydrophil gemachtes Tuch mit der Oberfläche kontaktiert, worauf ein geeigneter Druck auf die Anordnung zur einheitlichen Verbindung derselben mit der Klebstoffschicht angewandt wird.

Bei der quantitativen Analyse einer wäßrigen Probe unter Anwendung des mehrschichtiges chemischen Analysenmaterials gemäß der Erfindung wird häufig die Reflektionsdichte von der Seite des transparenten Trägers gemessen. Infolgedessen wird der Farblack günstigerweise auf der Seite näher der Seite gebildet, von der die Bestimmung erfolgt, als auf der Seite der Strahlungsblockierungsschicht, die das Licht streut. Insbesondere sind Materialien, worin das Metallsalz oder Oxid zur Farblackbildung zusammen mit dem hydrophilen Binder vorliegt, als Überzugsschichten unter der Reagensschicht, welche Urease und den Vorläufer des Farblacks enthält, äußerst vorteilhaft vom Gesichtspunkt der Bestimmung der Reflektionsdichte, da die Ausbildung des Farblacks in der dünnen Schicht auf der Seite konzentriert ist, auf der die Bestimmung erfolgt.

Materialien mit einem Gehalt von  $\text{TiO}_2$ , die auf der Reagensschicht als Strahlungsblockierungsschicht aufgezogen sind, erfordern nicht, daß das Metalloxid oder -salz zu der

Reagenschicht als Mittel zur Ausbildung des Farblackes zusätzelt wird, oder daß eine Komponentenschicht aus dem Oxid oder Salz ausgebildet wird. In diesem Fall liefert das  $TiO_2$  in der Strahlungsblockierungsschicht oder Lichtreflektierungsschicht das Metall zur Ausbildung des Farblackes.

Ausführungsformen der mehrschichtigen chemischen Analysenmaterialien gemäß der Erfindung für die Analyse wäßriger Flüssigkeiten sind nachfolgend unter Bezugnahme auf die schematischen Ansichten in den Fig. 1 bis 3 erläutert.

In der Fig. 1 ist eine einzige Reagenschicht 21, welche einen Farblackvorläufer, Urease, ein farblackbildendes Metallsalz oder Oxid, welches praktisch die Ureaseaktivität nicht hemmt, und ein in einem hydrophilen Binder dispergiertes Pufferungsmittel enthält, auf dem lichtdurchlässigen, wasserundurchlässigen Träger 11 ausgebildet. Eine Strahlungsblockierungsschicht 41 und eine poröse Probeausbreitungsschicht 31 sind in dieser Reihenfolge auf der Reagenschicht 21 hinsichtlich des Trägers 11 ausgebildet.

Wenn ein Bluttropfen auf die Probeausbreitungsschicht in der durch A angezeigten Richtung aufgebracht wird, breitet sich der Bluttropfen einheitlich etwa in dem gleichen Volumen je Einheitsfläche zur Reagenschicht 21 aus, wo der Harnstoff in dem Blut zu Ammoniak durch die Urease zersetzt wird. Das in dieser Weise gebildete Ammoniak ändert die Farbe des Vorläuferfarblackes unter Bildung eines Farblackes entsprechend der Menge des gebildeten Ammoniaks. Das Ausmaß der Färbung des dadurch gebildeten Farblackes wird von der mit B bezeichneten Seite zur Bestimmung des Harnstoffs gemessen.

Die Fig. 2 und 3 zeigen weitere Ausführungsformen, wo bei das Metallsalz oder Oxid zur Farblackbildung, die praktisch die Ureaseaktivität nicht hemmen, auf einer unabhängigen Schicht vorlegen. Die Fig. 2 zeigt ein Ausführungsform aus einem lichtdurchlässigen, wasserundurchdringlichen Träger 12, worauf aufeinanderfolgend eine Schicht aus einem Metall-

130021/0898

salz oder Oxid zur Bildung des Farbstofflackes 52, eine Reagensschicht 22 mit dem Gehalt eines Farblackvorläufers und Urease, eine Strahlungsblockierungsschicht 42 und eine poröse Probeausbreitungsschicht 32 ausgebildet sind, während die Fig. 3 eine Ausführungsform mit einem lichtdurchlässigen, wasserundurchdringlichen Träger 13 zeigt, worauf aufeinanderfolgend eine Schicht aus einem farblackbildenden Metallsalz oder Oxid 53, eine Reagensschicht 23 mit dem Gehalt eines Vorläufers eines Farbstofflackes und Urease und eine poröse Probeausbreitungsschicht 33, die auch als Strahlungsblockierungsschicht wirkt, ausgebildet sind. Wie in der Fig. 1 breitet sich in beiden Ausführungsformen der auf die Probeausbreitungsschicht aus der Richtung A aufgebrachte Bluttropfen zu der Reagensschicht aus, wobei der Harnstoff in dem Blut zu Ammoniak durch die Urease zersetzt wird und das Ausmaß der Farbausbildung des aus dem Farblackvorläufer gebildeten Farblacks wird aus der Richtung B zur Bestimmung von Harnstoff gemessen.

Erfindungsgemäß wird somit ein mehrschichtiges chemischen Analysenmaterial für die Analyse von wässrigen Flüssigkeiten vorgeschlagen, welches in einer Ausbildungsform

- (a) einen lichtdurchlässigen wasserundurchdringlichen Träger, welcher hierauf aufeinanderfolgend
- (b) eine Reagensschicht und
- (c) eine poröse Probeausbreitungsschicht umfaßt, vorgeschlagen, wobei
  - (i) die Reagensschicht (b) den Vorläufer des Farbstofflackes dispergiert in einem hydrophilen Binder enthält,
  - (ii) Urease in eine Reagensschicht (b) oder in eine Schicht anstoßend an die Reagensschicht (b) einverleibt ist und
  - (iii) ein Metallsalz oder ein Metalloxid zur Ausbildung des Farblackes, welche praktisch die Aktivität der Urease nicht hemmen, in die Reagensschicht (b) oder

130021/0896

in eine Schicht anstoßend an die Reagenschicht (b) einverleibt sind oder ein Metallsalz oder ein Metalloxid zur Ausbildung eines Farblackes in eine Schicht anstoßend an die Reagenschicht (b) einverleibt sind, während in einer zweiten Ausbildungsform das chemische Analysenmaterial (d) eine zwischen der Reagenschicht (b) und der porösen Probeausbreitungsschicht (c) zwischengeschichteten Strahlungsblockierungsschicht enthält.

Die Erfindung wird nachfolgend im einzelnen anhand der Beispiele erläutert, die jedoch die Erfindung in keiner Weise begrenzen.

Falls nichts anderes angegeben ist, sind sämtliche Prozentsätze, Teillangaben, Verhältnisse und dergleichen auf das Gewicht bezogen. Sämtliche Stärkeangaben sind als Trockenstärken angegeben.

#### Beispiel 1

250 mg von in 0,5 ml Äthanol und 5 ml Wasser gelöstem Hämatoxylin wurden tropfenweise zu einer Lösung zugesetzt, die aus 1 g Gelatine, 50 mg Aerosol OT (Bezeichnung des oberflächenaktiven Mittels Dioctylnatriumsulfosuccinat der Wako Junyaku Co., Ltd.), 50 mg Dinatriumäthylendiamintetraacetat (EDTA·2Na) und 14 g Wasser aufgebaut war, zur Herstellung einer einheitlichen Lösung zugesetzt. 80 mg Urease (Produkt der Toyo Spinning Co., Ltd., spezifische Aktivität 6 Einheiten/mg) wurden hierzu zugegeben und die erhaltene Überzugslösung wurde auf einen 180  $\mu\text{m}$  dicken, farblosen, transparenten Polyäthylenterephthalatfilm (PET) zu einer Trockenstärke von etwa 7  $\mu\text{m}$  zur Ausbildung der Reagenschicht aufgezogen.

130021/0896

Dann wurde eine aus Titandioxid, Gelatine, oberflächenaktivem Mittel (Aerosol OT) und Wasser (Gewichtsverhältnis 34 : 13,4 : 0,18 : 240) auf der Reagensschicht zu einer Stärke von 8  $\mu\text{m}$  ausgebildet. Anschließend wurde eine Gelatineschicht zu einer Stärke von etwa 3  $\mu\text{m}$  hierauf als Haftungsschicht ausgebildet und noch im nassen Zustand auf ein breites Baumwolltuch (Produkt der Toyo Spinning Co., Ltd., 100 % Baumwolle, 100 Paare) gepreßt, das hydrophil mit 0,2 % Nonion HS 210 (Bezeichnung eines Polyoxyäthylen-nonylphenoxyäthers der Nippon Oils & Fats Co., Ltd.) gemacht worden war, zur Herstellung eines mehrschichtigen chemischen Analysenblattes gepreßt.

Standard-Blutharnstoff-Stickstoff-Lösungen (BUN), welche durch Einstellung des pH-Werts von 7 %-igen Albuminlösungen mit einem Gehalt bestimmter Mengen an Harnstoff auf 7,4 mit einer Phosphatpufferlösung hergestellt worden waren, wurden auf das vorstehend beschriebene Blatt in einer Menge von 10  $\mu\text{l}$  je Lösung aufgetropft. Nach 10 Min. bei 30°C wurde die optische Reflektionsdichte im Mittelteil unter Anwendung eines Macbeth-Reflektionsdensitometers RD514 (maximale Durchlässigkeitsswellenlänge 600 nm) gemessen.

Die optischen Reflektionsdichten gegenüber verschiedenen BUN-Konzentrationen sind in der nachfolgenden Tabelle I aufgeführt.

Tabelle I

BUN-Konzentration (mg/dl)

	<u>5</u>	<u>10</u>	<u>15</u>	<u>20</u>	<u>25</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>75</u>	<u>100</u>
Optische Dichte	0,30	0,38	0,48	0,58	0,67	0,96	1,19	1,55	1,70

130021/0896

Beispiel 2

250 mg eines in einer Lösung aus einem Gemisch von 0,25 ml Äthanol und 0,24 ml  $C_{11}H_{23}CON(C_2H_5)_2$  gelösten Hämatoxylins wurden zu einer wäßrigen Lösung (11,5 ml), welche 1 g Gelatine, 50 mg eines oberflächenaktiven Mittels (Aerosol OT), 100 mg Urease und 50 mg EDTA·2Na enthielt, zugesetzt und nach der Emulgierung und Dispergierung unter Anwendung eines Ultraschallemulgators NS 250 der Hino Seiki K.K. wurde die Masse auf einen 180  $\mu m$  dicken farblosen transparenten Polyäthylenterephthalatfilm zu einer Trockenstärke von etwa 7  $\mu m$  aufgezogen. Anschließend wurde eine Titandioxidschicht, eine Haftsicht und eine Probeausbreitungsschicht in dieser Reihenfolge auf der vorstehend angegebenen Schicht in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 ausgebildet, so daß ein mehrschichtiger chemischer Analysenbogen erhalten wurde.

Beispiel 3

80 mg Urease wurden zu 14 g einer wäßrigen Lösung mit dem Gehalt von 1 g Gelatine, 50 mg oberflächenaktivem Mittel (Aerosol OT), 50 mg EDTA·2Na und 50 mg Eisen-Natriumäthylendiamintetraacetat (EDTA·Fe(III)·Na) zugesetzt. Dann wurden 250 mg Hämatoxylin in 0,5 ml Äthanol hierzu zugegeben und die erhaltene Lösung auf einen 180  $\mu m$  dicken farblosen transparenten Polyäthylenterephthalatfilm (PET) zu einer Trockenstärke von etwa 7  $\mu m$  aufgezogen. Nach der Trocknung wurden dieselben Überzugsverfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, so daß ein mehrschichtiges chemisches Analysenblatt erhalten wurde.

Beispiel 4

Unter Anwendung der in Beisp. 1 3 beschriebenen Verfahren wurde eine 150  $\mu m$  dicke Schicht (Micro Filter FM500

130021/0896

der Fuji Photo Film Co., Ltd.) unter feuchten Bedingungen zur Ausbildung einer porösen Probeausbreitungsschicht aufgepreßt. Dadurch wurde ein mehrschichtiges chemischen Analysenblatt hergestellt.

### Beispiel 5

Eine wässrige Lösung mit dem Gehalt von 20 g Gelatine, 0,1 g eines oberflächenaktiven Mittels (Aerosol OT) und 0,4 g EDTA·Fe(III)·Na wurde auf einer 180  $\mu\text{m}$  dicken farblosen transparenten Polyäthylenterephthalatfilm (PET) zu einer Trockenstärke von etwa 7  $\mu\text{m}$  zur Bildung einer ersten Schicht aufgezogen. Dann wurde eine Lösung aus 1 g Gelatine, 0,05 g EDTA·2Na, 0,08 g Cresol, 0,025 g Hämatoxylin, 0,5 g Ethanol und 10,5 g Wasser auf die erste Schicht zu einer Trockenstärke von etwa 12  $\mu\text{m}$  zur Bildung einer zweiten Schicht aufgezogen. Eine Titanoxidschicht von 8  $\mu\text{m}$  Stärke und eine Haftungsschicht von 3  $\mu\text{m}$  Stärke wurden aufeinanderfolgend auf der zweiten Schicht in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 ausgebildet und die gleiche Art eines breiten Baumwolltuches wie in Beispiel 1 wurde weiterhin hierauf zur Bildung eines mehrschichtigen chemischen Analysenblattes ausgebildet.

10  $\mu\text{l}$  eines frisch heparinisierten Blutes wurden auf ein Stück des dabei erhaltenen mehrschichtigen chemischen Analysenblattes aufgetropft und nach der Inkubierung bei 30°C während 10 Min. wurde die optische Reflektionsdichte in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 gemessen und zu 0,42 bestimmt.

Getrennt wurden 10  $\mu\text{l}$  Blutplasma, welche durch Zentrifugierung des vorstehend angegebenen heparinisierten Blutes erhalten worden waren, auf das gleiche Versuchsstück aufgetropft und die optische Reflektionsdichte wurde in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 nach einer Inkubierung während 10 Min. gemessen und sie betrug 0,46.

130021/0896

31.

3042857

### Beispiel 6

Auf einen mit einem Gelatineunterüberzug überzogenen 180  $\mu\text{m}$  dicken farblosen transparenten Polyäthylenterephthalat-film (PET) wurde eine Überzugslösung aus 1 g Gelatine, 400 mg EDTA-Fe(III)-Na und 10 ml Wasser zu einer Trockenstärke von 2  $\mu\text{m}$  zur Bildung einer ersten Schicht aufgezogen. Dann wurde eine durch Auflösung von 1 g Gelatine, 50 mg eines oberflächenaktiven Mittels (Aerosol OT), 250 mg EDTA-2Na, 110 mg EDTA-4Na und 63 mg Hämatoxylin in 10 ml Wasser hergestellte Überzugslösung auf die erste Schicht zu einer Trockenstärke von 10  $\mu\text{m}$  zur Bildung einer zweiten Schicht aufgezogen. Ferner wurden 80 mg Urease (Produkt der Toyo Spinning Co., Ltd., spezifische Aktivität 6 Einheiten/mg) zu einer Überzugslösung zugesetzt, die aus  $\text{TiO}_2$ , Gelatine, oberflächenaktivem Mittel (Aerosol OT) und Wasser aufgebaut war (Gewichtsverhältnis 34 : 13,4 : 0,18 : 240) und auf die zweite Schicht zu einer Trockenstärke von 8  $\mu\text{m}$  aufgezogen. Dann wurde eine Klebstoffschicht aus einer Gelatineschicht mit einer Trockenstärke von 3  $\mu\text{m}$  darauf ausgebildet, worauf darauf eine Probeausbreitungsschicht ausgebildet wurde, die aus einem breiten Tuch (100 Paare) aufgebaut war, welches hydrophil in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 gemacht worden war, so daß das mehrschichtige chemische Analysenblatt vervollständigt wurde.

### Beispiel 7

Ein mehrschichtiges chemisches Analysenblatt wurde in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 hergestellt, wobei jedoch ein durch Verweben eines Mischgarnes aus Baumwollgarn mit einer Zählung von 60 und einer Polyesterfaser (PET) (Baumwollefraktion 35 %, Polyesterfraktion 65 %) anstelle des breiten Baumwolltuches verwendet wurde. Unter Anwendung des in dieser Weise hergestellten mehrschichtigen chemischen Analysenblattes wurde der Test wie in Beispiel 1 ausgeführt, wobei die gleichen Ergebnisse wie in Beispiel 1 r-

130021/0896

3042857

33.

3. *Leopoldina*

halten wurden.

Die Erfindung wurde vorstehend anhand bevorzugter Ausführungsformen beschrieben, ohne daß die Erfindung hierauf begrenzt ist.

130021/0896

**BAD ORIGINAL**

3042857

- 35 -

Nummer:  
Int. Cl.3:  
Anmeldetag:  
Offenlegungstag:

30 42 857  
C 12 Q 1/58  
13. Nov 1980  
21. Mai 1981

FIG. 1

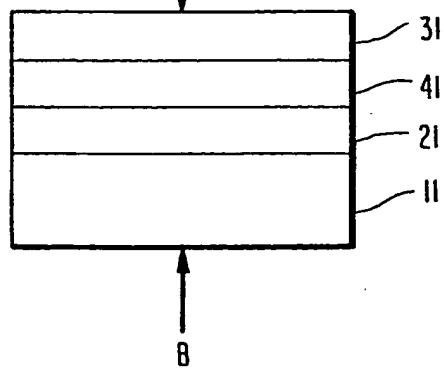


FIG. 2

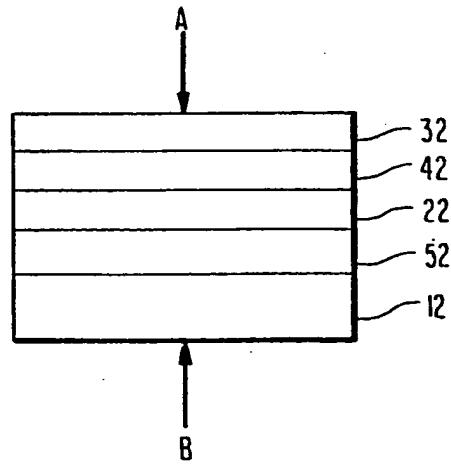
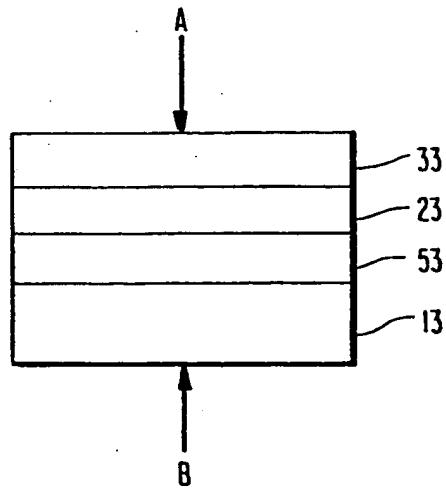


FIG. 3

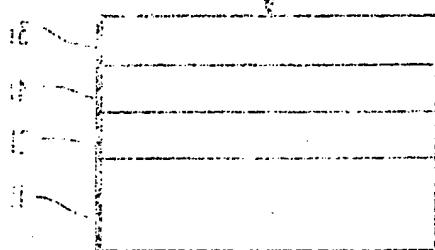


130021/0890

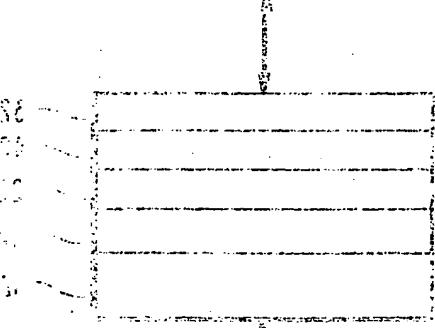
13.10.1942  
00 10 1942  
0001000000000000  
1000000000000000

0000000000000000  
0000000000000000  
0000000000000000  
0000000000000000

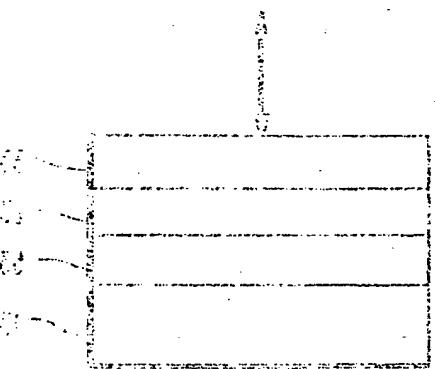
34. 08.1942  
Leerseite



1.00



1.00



1.00

08.08.1942

BAD ORIGINAL